การประยุกต์ใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติก ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

Application of Antimicrobial Compounds from Lactic Acid Bacteria for Inhibiting Food Borne Pathogens

ภาวิณี ศิลาเกษ* **และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ**

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ถ.จิระ อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 30000

*Email: spawinee@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายส่วนใส (Crude Filtrate Supernatant Fluid; CFSF) จากแบคทีเรียกรดแลคติก ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของมนุษย์ 4 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonalla*Typhimurium TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และ *Bacillus cereus* TISTR 678 โดยวิธี Agar well diffusion เมื่อทำการทดสอบสมบัติแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด พบว่าไม่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน นำ CFSF จากแบคทีเรียกรดแลคติกมาบ่มที่อุณหภูมิและพีเอชแตกต่างกันเพื่อทดสอบความคงตัวการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่อุณหภูมิและพีเอชทดสอบและศึกษาค่ากิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 4 ชนิด พบว่า CFSF จากแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 4 ชนิดที่ทุกอุณหภูมิในแต่ละเวลาการบ่มแต่มีแนวโน้มการยับยั้งลดลงที่อุณหภูมิสูงในเวลาการบ่มที่ยาวนาน คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งที่สูง 5 ไอโซเลต คือ S9B, M1A, M2A, G7B และ G8A เพื่อทดสอบการลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในกุ้งฝอย พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลตที่สามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 4 ชนิดได้ดีคือ ไอโซเลต G7B โดยสามารถลดปริมาณของเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonalla* Typhimurium TISTR 292 , *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และ *Bacillus cereus* TISTR 678 ได้ดีที่สุดที่เวลา 60 นาทีร้อยละ 92.24, 91.14, 74.89 และ 86.02 ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต G7B ไปจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีทดสอบทางชีวเคมี (ใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ VITEK 2 compact) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต G7B คือสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum*

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

Abstract

The experiment was conducted to determine the efficiency of Crude Filtrate Supernatant Fluid (CFSF) of lactic acid bacteria, in inhibiting 4 species of food borne pathogenic bacteria; *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonalla* Typhimurium TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 and *Bacillus cereus* TISTR 678 by agar well diffusion method. After the experiment, Enzyme properties of these supernatants were tested and it was found that all supernatants were not a bacteriocin. Isolations were selected and tested for stability of pH and temperature conducted. Inhibition of food borne pathogenic bacteria from all supernatants were found at all temperature tested. However, inhibition of bacteria tended to reduce in longer period of incubation at high temperature. Inhibition efficiency of CFSF from isolations of lactic acid bacteria was studied. The best 5 inhibition efficiency of CFSF from lactic acid bacteria (S9B, M1A, M2A,

G7B and G8A) were selected for examining the reduction of food borne pathogenic bacteria contaminated in Lanchester's freshwater prawn. From the results, G7B was the best inhibition efficiency to reduce the contamination of food borne pathogenic bacteria at 60 mins (92.24%; *Escherichia coli* TISTR 780, 91.14%; *Salmonalla* Typhimurium TISTR 292, 74.89%; *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 and 86.2%; *Bacillus cereus* TISTR 678). From the biochemical tests (VITEK 2 compact method), G7B was identified as *Lactobacillus plantarum*

Keywords: Lactic acid bacteria; Food borne pathogenic bacteria

บทนำ

กุ้งจ่อมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียงเหนือในอำเภอประโคนชัย จังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่พัฒนามาจากการทำปลาหมักที่เรียกว่าปลาจ่อม โดยนำกุ้งฝอยที่จับได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติมาหมักกับเกลือหรือน้ำปลาและข้าวคั่วนานประมาณ 5-7 วัน เนื่องจากไม่มีการใช้ความร้อนใดๆ ในกระบวนการผลิตกุ้งจ่อม ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในกุ้งฝอยอาจเป็นอันตรายกับผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางเดินอาหาร มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารหมักพื้นบ้านชนิดที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนก่อนการบริโภคได้แก่ ปูเค็ม กุ้งจ่อม หรือปลาจ่อม พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Escherichia coli* เป็นต้น [1] นอกจากนี้ในการศึกษาโรคอาหารเป็นพิษในอาหารหมักดองพื้นบ้านพร้อมบริโภค (กุ้งจ่อม, ปูดอง, ปลาร้าและปลาจ่อม) พบว่าในกุ้งจ่อม 34 ตัวอย่างมีการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* จำนวน 4 ตัวอย่างและพบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 1 ตัวอย่าง [2] แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มักพบในอาหารหมักดองพบมากในอาหารกลุ่มเนื้อปลาหรือกุ้งหมัก ได้แก่ *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus pentosu*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* sp. และ *Leuconostoc* sp. นอกจากนี้ [3] พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้สารยับยั้งจุลินทรย์ดังกล่าว เช่น กรดอินทรีย์, ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์, คาร์บอนไดออกไซด์, อะซีทัลดีไฮด์และแบคเทอริโอซิน รวมถึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งปนเปื้อนมากับอาหารได้เช่น *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium* perfringens เป็นต้น [4] ดังนั้นหากสามารถนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมาประยุกต์ใช้งานด้านผลิตภัณฑ์อาหารหมักจะมีประโยชน์อย่างยิ่ง เช่น ใช้ในการยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งฝอยก่อนนำมาทำผลิตภัณฑ์กุ้งจ่อมเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและทดแทนการใช้สารกันเสียที่เป็นสารสังเคราะห์และอาจเกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคหากใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์แหนมเห็ด ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร 4 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISTR 687, *Salmonalla* Typhimurium TISTR 1466, *Staphylococcus aureus* TISTR 780 และ *Bacillus cereus* TISTR 292 รวมถึงการศึกษาสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ ได้แก่ ความทนทานต่อความเป็นกรด-ด่าง, การทนความร้อน รวมถึงสมบัติของสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคว่าเป็นสารแบคเทอริโอซินหรือไม่ หลังจากนั้นนำส่วนสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกมาประยุกต์ใช้ในการแช่กุ้งฝอยก่อนนำมาผลิตกุ้งจ่อม เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งเป็นการเพิ่มความปลอดภัยให้กับผลิตภัณฑ์อาหารแก่ผู้บริโภค

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากแหนมเห็ดมี 26 ไอโซเลต [5] ได้แก่ O3A, S3A, O7A, S9B, S7A, G2B, S7B, G7B, G8A, C5B, O10A, M4A, C6A M7A, C1B, G7A, C3B, V2A, M1A, V7C, M6A, M2A, M6B, M5A, M8A และ M8B โดยเลี้ยงในอาหาร MRS (de Man Rogosa Sharpe) agar ที่มี 0.004 เปอร์เซ็นต์ของ bromocresol purple และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนเป็นเวลา 1-2 วัน

2. แบคทีเรียทดสอบที่ใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบมี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292, *Bacillus cereus* TISTR 678 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก (ดัดแปลงจาก [6])

โดยการนำแบคทีเรียกรดแลคติก มา streak ลงบนอาหาร MRS (de Man Rogosa Sharpe) agar ที่มี 0.004 เปอร์เซ็นต์ของ bromocresol purple บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนเป็นเวลา 1-2 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยวที่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีแดงเป็นสีเหลืองรอบโคโลนี นำไป restreak บนอาหาร MRS agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ย้อมสีแกรมตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ออกซิเดส เลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ออกซิเดส [7]

4. การทดสอบชนิดของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี agar well diffusion (ดัดแปลงจาก [8])

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไปเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก กรองให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านตัวกรองปราศจากเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายส่วนใส (Crude Filtrate Supernatant Fluid; CFSF) และแบ่งออกเป็น 4 ส่วนดังนี้ 1) ส่วนที่ไม่มีการปรับค่า pH 2) ส่วนที่นำมาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.0ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล และ 3) ส่วนที่ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.0 นำมาบ่มร่วมกับเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที 4) ส่วนที่ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.0 ที่ผ่านการบ่มร่วมกับเอนไซม์คะตะเลสแล้ว นำมาบ่มกับ proteolytic enzyme ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ proteinase K 33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร α-chymotrypsin 66 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และ trypsin 105 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้น ปิเปตสารละลายส่วนใส (Crude Filtrate Supernatant Fluid; CFSF) ทั้ง 4 ส่วนๆละ 35 ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งผสมแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบซึ่งเจาะหลุมไว้แล้ว (ทำการทดลองละ 6 ซ้ำ) แล้วบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโซนยับยั้งรอบๆหลุม

5. การศึกษาสมบัติความคงตัวของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (ดัดแปลงจาก [9])

5.1 ความคงตัวของการออกฤทธิ์ที่อุณหภูมิทดสอบ

นำ CFSF ที่ได้จากข้อ 4 มาบ่มที่อุณหภูมิทดสอบ 37, 50, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที และทดสอบความคงตัวในการออกฤทธิ์ antibacterial activity ด้วยวิธี agar well diffusion

5.2 ความคงตัวของการออกฤทธิ์ที่พีเอชทดสอบ

นำ CFSF ที่ได้จากข้อ 4 มาปรับ pH ให้อยู่ในช่วง pH 3, 4, 5, 7, 9 โดยใช้ 1 M HCl หรือ 1 N NaOH บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion

6. การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

โดยนำ CFSF ที่ได้จากข้อ 4 มาทำให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นปิเปต CFSF 35 ไมโครลิตรใส่ลงหลุมในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งผสมแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบซึ่งเจาะหลุมไว้แล้ว (ความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^5 CFU/ml) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโซนยับยั้ง (inhibition zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง หาค่ากิจกรรมการยับยั้งจากค่าการเจือจางสูงสุดที่ยังคงเห็นบริเวณโซนใส (clear zone) ของการยับยั้งชัดเจนและคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตร (Arbitrary Unit, AU/ml) ด้วยวิธี Critical dilution (ดัดแปลงจาก [10]) จากสมการดังนี้

$$\text{Arbitrary Unit (AU/ml)} = DF_i \, 1000/ (V)$$

โดยที่

DFi = ค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดที่พบการยับยั้ง

V = ปริมาตรของสารละลายส่วนใส (CFSF) ที่ปลอดเชื้อ (µl)

7. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ปนเปื้อนในกุ้งฝอยโดย CFSF ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำได้โดยใช้กุ้งฝอยทั้งตัวรวมทั้งเปลือกและหัวที่ซื้อจากตลาดสด อ.เมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ล้างน้ำให้สะอาด นำมาฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตัวกุ้งฝอยทั้งหมดก่อนทำการทดลอง จากนั้นแบ่งเป็น 3 ส่วน (ทำการทดลองส่วนละ 3 ซ้ำ) ส่วนละ 0.5 กรัม โดยกุ้งทั้ง 3 ส่วนจะถูกทำให้ปนเปื้อนโดยการจุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารแต่ละชนิดก่อน โดยจะจุ่มกุ้งฝอยลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารเข้มข้น 10^5 CFU/ml ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นาน 1 นาที ต่อจากนั้นทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารโดยจุ่มกุ้งฝอยลงใน CFSF จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เวลาแตกต่างกัน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ไม่จุ่มกุ้งฝอยลงใน CFSF (control)

ส่วนที่ 2 จุ่มกุ้งฝอยลงใน CFSF ปริมาตร 5 มิลลิลิตรนาน 30 นาที

ส่วนที่ 3 จุ่มกุ้งฝอยลงใน CFSF ปริมาตร 5 มิลลิลิตรนาน 60 นาที จากนั้นสุ่มตัวอย่างกุ้งฝอยมาหาปริมาณแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารด้วยวิธีการ spread plate บน Nutrient agar (ทำการทดลองส่วนละ 6 ซ้ำ) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

8. จำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

จำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์สูงที่สุดและสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ปนเปื้อนในกุ้งฝอยได้ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้วิธีทางชีวเคมี (ใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ VITEK 2 compact) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

9. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan New's Multiple

Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากแหนมเห็ด 26 ไอโซเลตโดยการย้อมสีแกรมและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดส พบว่าเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมมี 20 ไอโซเลต รูปร่างท่อนมี 6 ไอโซเลต และแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ออกซิเดส

2. ผลการทดสอบชนิดของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่สร้างโดย CFSF จากแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี agar well diffusion

สารส่วนใส (CFSF) ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลตนำมาศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (ตารางที่ 1) จากผลการทดสอบพบว่า มีการแสดงโซนยับยั้ง *E. coli* TISTR 780 สูงสุดจากสารส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต G7B ส่วนโซนยับยั้ง *B. cereus* TISTR 687 สูงสุดจากสารออกฤทธิ์ของไอโซเลต M8B สำหรับโซนยับยั้ง *S.* Typhimurium TISTR 292 พบสูงสุดจากการทดสอบด้วยสารออกฤทธิ์ของไอโซเลต G7B และ M2A และสำหรับการเกิดการโซนยับยั้ง *S. aureus* TISTR 1466 สูงสุดจากการทดสอบด้วยแบคทีเรียไอโซเลต S7B เมื่อคัดเลือกจากขนาดและความสม่ำเสมอของโซนยับยั้ง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 10 ไอโซเลต ได้แก่ M1A, M2A, M4A, M5A, M8A, M8B, S7B, S9B, G7B, G8A ซึ่งสามารถแสดงการเกิดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งได้ในช่วง 0.80 - 1.20 เซนติเมตร (ตารางที่ 1) ขนาดโซนยับยั้งเป็นรูปแบบหนึ่งของการแสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารโดยสารทดสอบ เช่น กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ [11] และสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่แยกได้จากมะกอกเขียวดองมีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบได้ [12]

ตารางที่ 1 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 4 ชนิดด้วยสารละลายส่วนใส (CFSF) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 26 ไอโซเลต

สารละลายส่วนใส (CFSF) ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก	ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (เซนติเมตร)			
	Escherichia coli **TISTR 780**	***Salmonella*** **Typhimurium TISTR292**	***Bacillus cereus*** **TISTR687**	***Staphylococcus aureus*** **TISTR1466**
M 1 A	$1.10\pm0.00^{ab,A}$	$1.10\pm0.00^{ab,A}$	$0.83\pm0.06^{ab,B}$	$0.80\pm0.00^{e,B}$
M 2 A	$1.10\pm0.00^{ab,A}$	$1.13.\pm0.06^{a,A}$	$0.83\pm0.06^{ab,B}$	$0.90\pm0.00^{cd,B}$
M 4 A	$1.10\pm0.00^{ab,A}$	$1.10\pm0.00^{ab,A}$	$0.85\pm0.07^{ab,B}$	$0.90\pm0.00^{cd,B}$
M 5 A	$0.90\pm0.00^{d,B}$	$1.10\pm0.00^{ab,A}$	$0.87\pm0.06^{ab,B}$	$1.10\pm0.00^{b,A}$
M 6 A	$0.75\pm0.07^{g,A}$	$0.60\pm0.00^{i,B}$	$0.80\pm0.00^{bc,A}$	$0.60\pm0.00^{g,B}$
M 7 A	$0.80\pm0.00^{fg,B}$	$0.60\pm0.00^{i,C}$	$0.63\pm0.06^{ef,C}$	$0.93\pm0.06^{c,A}$
M 8 A	$0.90\pm0.00^{d,B}$	$0.90\pm0.00^{de,B}$	$0.85\pm0.07^{ab,B}$	$1.10\pm0.00^{b,A}$
M 6 B	$0.90\pm0.00^{d,A}$	$0.60\pm0.00^{i,B}$	$0.63\pm0.06^{ef,B}$	$0.60\pm0.00^{g,B}$
M 8 B	$1.07\pm0.06^{bc,A}$	$1.07\pm0.06^{bc,A}$	$0.90\pm0.00^{a,B}$	$0.90\pm0.00^{cd,B}$
S 3 A	$0.60\pm0.00^{h,C}$	$0.73\pm0.06^{h,AB}$	$0.80\pm0.00^{bc,A}$	$0.70\pm0.00^{f,B}$
S 7 A	$0.80\pm0.00^{fg,B}$	$0.93\pm0.06^{d,A}$	$0.70\pm0.00^{de,C}$	$0.87\pm0.06^{d,AB}$
S 7 B	$0.87\pm0.06^{de,B}$	$1.07\pm0.06^{bc,A}$	$0.87\pm0.00^{ab,B}$	$1.20\pm0.10^{a,A}$
S 9 B	$0.90\pm0.00^{d,C}$	$1.03\pm0.06^{c,B}$	$0.87\pm0.06^{ab,C}$	$1.15\pm0.07^{ab,A}$
G 7 A	$0.85\pm0.07^{def,A}$	$0.83\pm0.06^{fg,A}$	$0.80\pm0.00^{bc,A}$	$0.70\pm0.00^{f,B}$
G 2 B	$0.90\pm0.00^{d,A}$	$0.80\pm0.00^{g,B}$	$0.80\pm0.00^{bc,B}$	$0.70\pm0.00^{f,C}$
G 7 B	$1.15\pm0.07^{a,A}$	$1.13\pm0.06^{a,A}$	$0.90\pm0.00^{a,B}$	$1.10\pm0.00^{b,A}$
G 8 A	$1.03\pm0.06^{c,B}$	$1.10\pm0.00^{ab,A}$	$0.90\pm0.00^{a,C}$	$1.10\pm0.00^{b,A}$
C 6 A	$0.80\pm0.00^{fg,B}$	$0.90\pm0.00^{de,A}$	$0.67\pm0.06^{def,C}$	$0.60\pm0.00^{g,D}$
C 1 B	$0.90\pm0.00^{d,A}$	$0.90\pm0.00^{de,A}$	$0.70\pm0.00^{de,B}$	$0.60\pm0.00^{g,C}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

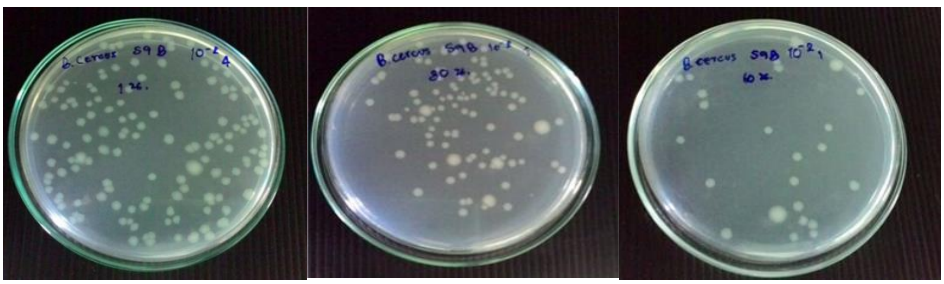
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 4 ชนิดที่เหลืออยู่ภายหลังจากการแช่ในสารละลาย ส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลตที่เวลาแตกต่างกัน คือ 0 นาที (control), 30 นาทีและ 60 นาที

แช่ CFSF ที่เวลาต่าง ๆ	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (CFU/ml)			
	***Bacillu cereus* TISTR 687**	***Staphylococcus aureus* TISTR1466**	***Escherichia coli* TISTR780**	***Salmonella* Typhimurium TISTR292**
S9B 0 นาที	$[(28\pm2.82)\times10^{4}]^{a}$	$[(69.5\pm7.77)\times10^{4}]^{a}$	$[(94.5\pm2.12)\times10^{5}]^{a}$	$[(51\pm5.65)\times10^{6}]^{a}$
S9B 30 นาที	$[(103\pm2.82)\times10^{3}]^{b}$	$[(56.5\pm3.33)\times10^{4}]^{a}$	$[(62\pm0)\times10^{5}]^{b}$	$[(27.5\pm2.12)\times10^{6}]^{b}$
S9B 60 นาที	$[(82.5\pm3.53)\times10^{3}]^{b}$	$[(56\pm15.55)\times10^{3}]^{b}$	$[(27.5\pm2.12)\times10^{5}]^{c}$	$[(46\pm12.72)\times10^{5}]^{c}$
M1A 0 นาที	$[(276.5\pm6.5)\times10^{4}]^{a}$	$[(252.5\pm10.60)\times10^{4}]^{a}$	$[(168\pm4.24)\times10^{4}]^{a}$	$[(244\pm6.36)\times10^{4}]^{a}$
M1A 30 นาที	$[(139\pm1.41)\times10^{4}]^{b}$	$[(132\pm5.65)\times10^{4}]^{b}$	$[(150\pm9.89)\times10^{4}]^{ab}$	$[(180.5\pm13.45)\times10^{4}]^{ab}$
M1A 60 นาที	$[(77\pm0)\times10^{4}]^{c}$	$[(118.5\pm12.02)\times10^{4}]^{b}$	$[(142\pm6.36)\times10^{4}]^{b}$	$[(124\pm9.49)\times10^{4}]^{b}$
M2A 0 นาที	$[(117.5\pm3.53)\times10^{4}]^{a}$	$[(266\pm10.60)\times10^{4}]^{a}$	$[(68.5\pm4.94)\times10^{4})]^{a}$	$[(264.5\pm6.36)\times10^{4}]^{a}$
M2A 30 นาที	$[(74.5\pm3.53)\times10^{4}]^{b}$	$[(57\pm5.65)\times10^{4}]^{b}$	$[(49.5\pm3.53)\times10^{4})]^{b}$	$[(108.5\pm9.19)\times10^{4}]^{b}$
M2A 60 นาที	$[(250.5\pm2.92)\times10^{3}]^{c}$	$[(37\pm12.02)\times10^{4}]^{b}$	$[(29.5\pm0.70)\times10^{4}]^{c}$	$[(72\pm1.41)\times10^{4}]^{c}$
G7B 0 นาที	$[(35.5\pm2.12)\times10^{6}]^{a}$	$[(71\pm1.14)\times10^{4}]^{a}$	$[(125\pm12.72)\times10^{5}]^{a}$	$[(76\pm1.41)\times10^{5}]^{a}$
G7B 30 นาที	$[(54\pm4.24)\times10^{5}]^{b}$	$[(57\pm9.89)\times10^{4}]^{b}$	$[(247\pm3.11)\times10^{4}]^{b}$	$[(140.5\pm6.67)\times10^{4}]^{b}$
G7B 60 นาที	$[(47.5\pm13.43)\times10^{5}]^{c}$	$[(37\pm2.82)\times10^{4}]^{c}$	$[(97\pm5.65)\times10^{4}]^{c}$	$[(66\pm14.14)\times10^{4}]^{c}$
G8A 0 นาที	$[(107.5\pm0.70)\times10^{4}]^{a}$	$[(94\pm4.24)\times10^{5}]^{a}$	$[(95\pm22.62)\times10^{5}]^{a}$	$[(114.5\pm7.67)\times10^{5}]^{a}$
G8A 30 นาที	$[(82\pm9.89)\times10^{4}]^{b}$	$[(56.5\pm2.12)\times10^{5}]^{b}$	$[(74\pm16.79)\times10^{5}]^{ab}$	$[(94\pm2.82)\times10^{5}]^{a}$
G8A 60 นาที	$[(56.5\pm4.94)\times10^{4}]^{c}$	$[(49.5\pm3.53)\times10^{5})]^{c}$	$[(37\pm5.65)\times10^{5}]^{b}$	$[(83\pm5.65)\times10^{5}]^{a}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

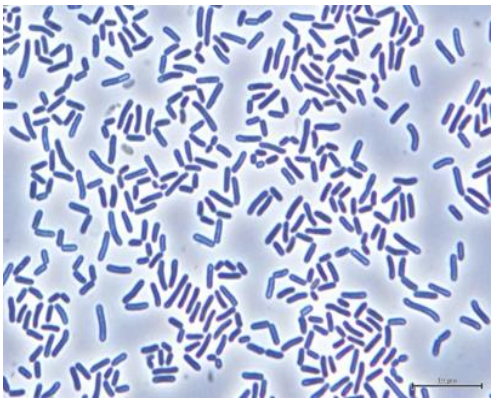
ตารางที่ 3 แสดงร้อยละที่ลดลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เหลืออยู่ภายหลังจากการแช่กุ้งฝอยใน CFSFของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลตที่เวลาแตกต่างกัน คือ 0 นาที (control), 30 นาทีและ 60 นาที

CFSF ที่แช่กุ้งฝอยระยะเวลาแตกต่างกัน	**ปริมาณที่ลดลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (ร้อยละ)**			
	Bacillu cereus **TISTR 687**	***Staphylococcus aureus*** **TISTR 1466**	***Escherichia coli*** **TISTR 780**	***Salmonella*** **Typhimurium TISTR 292**
S9B 0 นาที	0.00	0.00	0.00	0.00
S9B 30 นาที	63.22	18.91	34.05	46.08
S9B 60 นาที	70.54	91.75	71.28	90.99
M1A 0 นาที	0.00	0.00	0.00	0.00
M1A 30 นาที	49.64	47.73	26.48	26.09
M1A 60 นาที	72.18	53.07	38.24	49.19
M2A 0 นาที	0.00	0.00	0.00	0.00
M2A 30 นาที	36.60	78.58	27.74	58.98
M2A 60 นาที	51.92	86.91	56.94	72.78
G7B 0 นาที	0.00	0.00	0.00	0.00
G7B 30 นาที	84.79	19.18	40.24	81.52
G7B 60 นาที	86.62	74.89	92.24	91.14
G8A 0 นาที	0.00	0.00	0.00	0.00
G8A 30 นาที	23.28	39.90	22.11	17.91
G8A 60 นาที	47.45	47.38	61.16	27.52



(a) (b) (c)

ภาพที่ 5 ปริมาณเชื้อและลักษณะโคโลนีของ *Bacillus cereus* TISTR 687 ที่เหลืออยู่ภายหลังจากการแช่กุ้งฝอยในสารละลายส่วนใส (CFSF) ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต S9B ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน โดยที่ (a) คือ (ไม่แช่ CFSF; 0 นาที), (b) แช่ CFSF 30 นาที และ (c) แช่ CFSF 60 นาที



ภาพที่ 6 แสดงภาพที่ได้จากการย้อมสีแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต G7B สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum*

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 1 ไอโซเลต คือ G7B ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 4 ชนิดได้สูงที่สุดโดยมีค่ากิจกรรมในการยับยั้งอยู่ที่ 114.29 AU/ml และมีค่าความกว้างของโซนใสการยับยั้งอยู่ในช่วง 0.80 -1.20 เซนติเมตร จึงได้นำไปทำการจำแนกสายพันธุ์เพื่อที่จะได้สะดวกต่อการนำไปศึกษาต่อ โดยใช้วิธีทางชีวเคมี (ใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ VITEK 2 compact) จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่าไอโซเลต G7B คือสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ในการผลิตหรือการถนอมอาหารในกระบวนการอุตสาหกรรม เพื่อลดการใช้สารกันเสียหรือการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อโรคในทางเดินอาหารของมนุษย์ต่อไป

การจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารละลายส่วนใส (CFSF) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารควรใช้วิธีจำแนกอื่นๆร่วมกับวิธีทดสอบทางชีวเคมี เช่น การวิเคราะห์ลำดับเบส (16S DNA Identification by DNA sequencing)ร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมี (ใช้ชุดวิเคราะห์ VITEK 2 compact) เพื่อให้ได้ผลการจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แม่นยำมากขึ้น นอกจากนี้สารละลายส่วนใส (CFSF) ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้นั้น อาจเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดแอซีติก หรือกรดชนิดอื่นๆ ซึ่งควรมีการวิเคราะห์ว่าเป็นกรดอินทรีย์ชนิดใดเช่น วิธีการใช้ HPLC วิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ที่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตได้ เพื่อให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของกรดอินทรีย์ดังกล่าวต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและทำให้เข้าใจถึงกระบวนการที่เหมาะสมในการใช้สารละลายส่วนใส (CFSF) ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ต่อไป โดยอาจนำผลที่ได้จากการไปเผยแพร่ต่อกลุ่มแม่บ้านที่ผลิตกุ้งจ่อมที่อำเภอประโคนชัย จ.บุรีรัมย์ได้ทดลองใช้สารละลายส่วนใสจากแบคทีเรียกรดแลคติก (CFSF) แช่กุ้งฝอยในขั้นตอนการล้างกุ้งก่อนนำมาผลิตกุ้งจ่อมเพื่อลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ปนเปื้อนมาในกุ้งฝอย เพื่อให้ผลิตภัณฑ์กุ้งจ่อมเกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และทดแทนสารใช้กันเสียที่เป็นสารสังเคราะห์ซึ่งอาจเกิดโทษแก่ร่างกายได้ หากใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ที่ได้มอบทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] ฐิติภา มาลีหวล และคณะ. 2542. “การศึกษาความปลอดภัยของอาหารหมักพื้นบ้านชนิดที่ ไม่ผ่านการให้ความร้อนก่อนการบริโภค: หอยดองชนิดต่างๆ”. **อาหาร**. 29: 277- 282.

[2] อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ. 2547. “เชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารหมักดองพื้นบ้านพร้อมบริโภค (กุ้งจ่อม, ปูดอง, ปลาร้าปลาจ่อม)”. **อาหาร**. 34: 90-99.

[3] Tanasupawat, S., Okada, S. and Komagata, K. 1998. “Lactic Acid Bacteria Found in Fermented Fish in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol**. 44: 193 - 200.

[4] Cleveland, J. and et al. 2001. “Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preserv ation. **Int J. Food Microbiol**. 71: 1-20.

[5] เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ. 2557. “การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค ทางเดินอาหาร”. **วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์**. 9(2): 40-45.

[6] Peeler, J.T. and Maturin, L.J. 1992. Aerobic Plate Count. **Bacteriology Analytical Manual 7thed**. UD/FDA. Washington D.C. 17-26.

[7] Gelman A, Drabkin V, Glatman L. 2001. “Evaluation of Lactic Acid Bacteria, Isolated from Lightly Preserved Fish Product, as Starter Cultures for New Fish-Based Food Product”. **Innov Food Sci and Emerg Technol**. 1: 219-226

[8] Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C., and Filmore S. 2012. “Antimicrobial Activity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Cheeses and Yogurts”. **AMB express a Springer Open journal**. 2(48).

[9] Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni and A.A. Onilude. 2003. “Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1”. **Afr. J. Biotechnol.** 2(8): 219-227.

[10] Mayr-Harting A., Hedges A.J., and Berkeley R.C.W. 1972. “Method for Studying Bacteriocins”. **Meth. Microbiol.** 7A: 315-422.

[11] Remiger, A. and et al. 1999. “Purification and Partial Amino Acid and Sequence of Plantaricin 1.25 and 1.25 Two Bacteriocins Produced by Lactobacillus plantarum TMW 1.25”. **J Appl Microbiol.** 86: 1053-1058.

[12] Mourad K., Halima K.Z., and Nour-Eddine K. 2004. “Isolation of Lactic Acid Bacteria for Its Possible Use in The Fermentation of Green Algerian Olives”. **Grasas Aceites.** 55: 4: 385-393.

[13] Suskovic J., Kos B., Beganovic J., Pavunc L.A., Habjanic K., and Matosic S. 2010. “Antimicrobial Activity-the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria” .**Food technol biotech**. 48(3): 296-307.

[14] Conner A.D. and Kotrola S.J. 1994. “Growth and Survival of *Escherichia coli*) 157:H7 Under Acidic Conditions”. **Appl. Environ. Microbiol.** 61(1): 382-385.

[15] Thayer W.D., Muller S.W., Buchanan L.R., and Phillips G.J. 1987. “Effect of NaCl, pH, Temperature, and Atmosphere on Growth of *Salmonella typhimurium* in Glucose-Mineral Salts Medium”. **Appl. Environ. Microbiol.** 53(6): 1311-1315.

[16] ***Bacillus cereus***. 2010. “Prepared for NZFSA by ESR”. [cited 2015 March 10]. Available from: http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Bacillus_Cereus-Spore_For ming.pdf

[17] Albrecht A.J. 2005. *Staphylococcus aureus*. **Food safety**. University of Nebraska-Lincoln. Institute of Agriculture and Natural Resources. [Online] [cited 2015 March 20]. Available from: http://www.foodsafety.unl.edu/pathogens/staph.html

[18] Valero M., Fernández P.S., and Salmerón M.C. 2003. "Influence of pH and Temperature on Growth of *Bacillus cereus* in Vegetable Substrates". **Int. J. Food Microbiol**. 82(1): 71-79.

[19] ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ, บดินทร อิทธิพงษ์, สิริรัตน์ จงฤทธิพร และอัธยา กังสุวรรณ. 2547. "การประยุกต์ใช้แลคติคแอซิดแบคทีเรียเพื่อลดการปนเปื้อนของ *E.coli* ในกุ้งกุลาดำ". **สัมมนาวิชาการประมงประจำปี 2547**. 7-9 กรกฎาคม 2547, กรมประมง, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย.

[20] Ingraham L. John and C. A. Ingraham. 2000. **Introduction to Microbiology***;* 2 nd edition, Brool/Cole Thomson Learning, USA.

[21] Jyhshiun L., Lee I. S., James F., Slonczewski L.J. and Foster W.J. 1995. "Comparative Analysis of Extreme Acid Survival in *Salmonella* typhimurium, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*". **J Bacteriol**. 177(14): 4097-4104.

[22] Valero A., F. Pérez-Rodríguez., E. Carrasco., J.M. Fuentes-Alventosa., R.M. García-Gimeno. and G. Zurera. 2009. "Modelling the Growth Boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and Water Activity". **Int J Food Microbiol**.133: 186-194